

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ANTAGONISMO DE *Lactobacillus* spp. ISOLADOS DE
AVES DE POSTURA COMERCIAL, FRENTE A QUATRO SOROVARES
DE *Salmonella* spp.**

Natália Caroline Nascimento de Oliveira

Areia, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ANTAGONISMO DE *Lactobacillus* spp. ISOLADOS DE
AVES DE POSTURA COMERCIAL, FRENTE A QUATRO SOROVARES
DE *Salmonella* spp.**

Natália Caroline Nascimento de Oliveira

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária pela Universidade
Federal da Paraíba, sob orientação do
Professor Oliveira Caetano de Freitas
Neto.**

Areia, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Caroline Nascimento de Oliveira

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ANTAGONISMO DE *Lactobacillus* spp. ISOLADOS DE
AVES DE POSTURA COMERCIAL, FRENTE A QUATRO SOROVARES
DE *Salmonella* spp.

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em:

Nota:

Banca Examinadora

Profº. Drº. Oliveira Caetano de Freitas Neto, UFPB

Profº. Drº. Felipe Nael Seixas, UFPB

Profª. Drª. Suzana Aparecida Costa de Araujo, UFPB

Profº. Drº. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Coordenação de TCC

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Tatalice Nascimento e Jailton Fausto , por toda confiança, amor, sacrifícios e toda educação. A minha irmã Jéssica Thalita e a meus avós Maria das Dores e José Mendonça que sempre me incentivaram com muito carinho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, dando a coragem para continuar.

Aos meus pais, Tatalice Nascimento e Jailton Fausto, por tanto amor, carinho, dedicação, conselhos, esforço, pelas palavras, por sempre estarem comigo, nos melhores e piores momentos, obrigada pela confiança, por tantas vezes que por mais cansada que eu estivesse, só de pensar em vocês surgia uma força tamanha para continuar. Sei que a distância de todo esse tempo foi muito difícil, no início chorava quase sempre, mas, vocês me acalentavam quando necessário. Não foi fácil, mas, conseguimos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus avós Maria das Dores e José Mendonça que são verdadeiros anjos em minha vida, que sempre me passaram ensinamentos de como ser gentil, educada, respeitar ao próximo. E sempre de bom humor, me perguntavam como estava nos estudos e quando ia acabar.

A minha irmã, Jéssica Thalita que sempre me incentivou e me apoiou no que fosse preciso. Obrigada.

A minha tia Jaciane, que sempre me apoiou.

Às minhas primas, Thaís, Bia, Ericka e Nailma, que são mais que primas, quase irmãs. Pois sempre que precisei de ajuda, estavam ao meu lado, nos melhores momentos, muito obrigada por tudo.

Aos meus primos, Yuri, Isaac, Biel e Diogo por sempre passar momentos divertidos com vocês.

Aos meus cães, Beyle e Baruck, simplesmente por doarem tanto amor comigo, tanto afago, carinho, brincadeiras. Ao chegar em casa ser recebida tão bem com pulos e lambidas e mesmo exausta, fazem eu ir brincar.

Ao meu orientador, professor Oliveiro que durante essa trajetória, mesmo não percebendo me trouxe vários ensinamentos. Obrigada pela disponibilidade, pela orientação e esclarecimentos durante o trabalho. Por me mostrar essa área da avicultura, o quanto ela é rica e tem muito a nos oferecer. Além de aguçar minha vontade pela pesquisa, por ser tão gratificante e adquirir mais responsabilidade.

As professoras, Lara, Suzana e Satake, pelas oportunidades de monitoria, que foi uma das melhores experiências da minha graduação, o fato de conseguir passar o pouco do meu conhecimento para os outros, isso é muito gratificante. Meu muito obrigada.

Ao professor Felipe Nael, que com sua experiência e conselhos me ajudou bastante para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

A professora Ivia Carmem, que é um amor de pessoa, tornou-se muito mais que uma professora, tenho admiração tamanha, pois sempre tentou enxergar aqueles que a procurava, dando oportunidades e tive experiências que nunca pensei passar na graduação. Momentos inesquecíveis, nas extensões, experiências que levarei para toda vida. Obrigada professora.

Obrigada a todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica.

A todos meus amigos de graduação, que tornaram tudo ficar mais fácil, mais divertido, mais engraçado. Nos momentos difíceis e de superação nossa turma sempre foi unida e quantas vezes nos juntamos para estudar.

Neto Ferreira, sempre estudioso, é um referencial para mim. Obrigada pelos conselhos, pelas risadas, pela amizade verdadeira.

Obrigada, Isadora, Rayene e Quênia que desde o início estávamos unidas, com muito esforço, noites acordadas, muitas lágrimas, mas, conseguimos. Obrigada a Maria Kobayashi, Camilla, Lanne, Yanna, Allan, Lucas, Ricardo, Alvaro, por tantas risadas, saídas, aventuras, sem vocês não ia ter tantas histórias para contar.

Marcelo, Hívison, Gedean, Débora, Fernanda mendonça, Maria Caroline e Monalisa pela amizade, ensinamentos, estudos, momentos divertidos, obrigada por tudo.

A Kaliane, Monica, Laís, Ludmila, Pedrinho, obrigada por nestes últimos tempos estarem juntos a mim.

A Raphael Sousa, muito obrigada pela boa companhia, e os ótimos momentos nestes últimos meses.

Dani Lafetá, que apesar do tempo curto que nos aproximamos, sempre me acalmando e trazendo momentos divertidos no laboratório. Obrigada.

A Gilzane e Vânia, por me ensinarem tanto, em tão pouco tempo. Sempre me mostrando que eu devia sempre buscar o conhecimento, ler, pesquisar, incentivando a melhorar como profissional, sempre me aconselhando e mostrando o caminho certo. Por me acalmar e mostrar que sempre podemos começar novamente, obrigada pelos ensinamentos.

“Daí-me, Senhor, a perseverança das ondas do mar que fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo avanço”.

Gabriela Mistral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tubos contendo caldo MRS. A: Tubo inoculado, B: Tubo sem inoculação.	22
Figura 2. Colônias sugestivas de <i>Lactobacillus</i> spp. em ágar MRS.	23
Figura 3. Células bacterianas sugestivas de pertencerem ao gênero <i>Lactobacillus</i> coradas pelo método de Gram.	23
Figura 4. Tubos contendo 10 mL de BHI acrescidos de TSA, mantidos em banho-maria a 45°C para posterior utilização.	25
Figura 5. Halo de inibição produzido pelo <i>Lactobacillus</i> spp. frente a quatro sorovares de <i>Salmonella</i> spp. A: <i>Salmonella</i> Enteritidis, B: <i>Salmonella</i> Typhimurium, C: <i>Salmonella</i> Heidelberg e D: <i>Salmonella</i> Senftenberg.	26
Figura 6. Multiplicação de uma das estirpes <i>Salmonella</i> spp. no método “spot on the lawn”, apenas com inoculação de caldo MRS sem de <i>Lactobacillus</i> spp. (controle negativo).	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da inibição da multiplicação de <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Heidelberg</i> e <i>S. Senftenberg</i> frente ao isolado de <i>Lactobacillus</i> spp.	28
Tabela 2. Perfil de resistência a antimicrobianos de um isolado de <i>Lactobacillus</i> spp.	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

BHI: Caldo de infusão cérebro coração

CCA: Centro de Ciências Agrárias

cm: Centímetro;

EC: Exclusão competitiva;

MRS: Caldo DeMan-Rugosa & Sharpe

TSA: ágar triptona de soja

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UFC: Unidades formadoras de colônia

VB: Verde Brilhante

μL: Microlitro

RESUMO

OLIVEIRA, Natália Caroline Nascimento de. Universidade Federal da Paraíba, junho de 2016. **Isolamento de *Lactobacillus* spp. em aves de postura comercial para avaliação *in vitro* da atividade inibitória frente a quatro sorovares de *Salmonella* spp.** Orientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto.

Salmonella spp. é um dos principais causadores de infecção alimentar em humanos no mundo todo, sendo os alimentos de origem avícola contaminados a sua principal fonte. Uma vez introduzidos nos sistemas de produção avícola, esses microrganismos se disseminam rapidamente, favorecendo a contaminação de carne e ovos, além de piorar os índices zootécnicos. Por representarem um sério problema para a saúde pública e animal, muitos esforços têm sido direcionados para o controle de *Salmonella* nas criações avícolas. A utilização de produtos de exclusão competitiva (EC) seria uma das ferramentas disponíveis mais eficazes no controle destas bactérias. Os produtos de EC auxiliam na prevenção da entrada de um agente patogênico em um trato intestinal pré-colonizado. Neste caso, uma mistura de estirpes bacterianas, principalmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, isoladas de aves adultas é administrada a aves no primeiro dia de vida, acelerando o processo de amadurecimento da microbiota intestinal. O presente estudo objetivou isolar uma estirpe de *Lactobacillus* spp. de fezes cecais das aves de postura comercial e avaliar seu potencial para compor um produto comercial de EC. Para isso, avaliou-se o perfil de resistência a antimicrobianos e sua capacidade de inibir, por meio do método “spot on the lawn”, a multiplicação de quatro dos principais sorovares de *Salmonella* (*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* e *S. Heidelberg*). O isolado de *Lactobacillus* spp. provocou zona de inibição de mais de 2,6 cm na multiplicação de todos os sorovares, sendo que a inibição foi significativamente maior para *S. Enteritidis* (3,8 cm), valores considerados altos. O isolado apresentou resistência a cinco antibióticos de três classes diferentes (cefalotina, ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina e eritromicina). Portanto, embora a estirpe de *Lactobacillus* spp. isolada no presente estudo tenha mostrado capacidade de inibir a multiplicação de sorovares de *Salmonella* spp., a mesma apresentou multiresistência e seria indicada para fazer parte da formulação de um produto comercial de EC.

Palavras-chave: inibição, spot on the lawn, fezes cecais, *Salmonella* spp., aves de postura

ABSTRACT

OLIVEIRA, Natália Caroline Nascimento de. Federal University of Paraíba, June, 2016. **Isolation of *Lactobacillus* spp. from adult laying hens and assessment of its *in vitro* inhibitory activity against four serovars of *Salmonella* spp.** Supervisor: Oliveira Caetano de Freitas Neto.

Salmonella spp. is a major cause of food poisoning in humans worldwide, and the consumption of poultry products contaminated the main way of infection. Once introduced into poultry production systems, these microorganisms spread quickly, favoring the contamination of meat and eggs, in addition to disturb the performance indexes. *Salmonella* spp represents a serious problem for public and animal health; as a result, many efforts have been addressed to its control in poultry farming. The use of competitive exclusion products (CE) would be the most effective tools available to control these bacteria. CE products assist in the prevention of entry of a pathogen into a pre-colonized intestinal tract. In this case, a mixture of bacterial strains, especially belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, isolated from adult birds is orally administered to chicks on the first day of life, accelerating the maturation process of the gut microbiota. This study aimed to isolate a strain of *Lactobacillus* spp. of cecal feces of adult laying hens and to assess its potential to make a commercial CE product. For this, we evaluated the antimicrobial resistance profile and its ability to inhibit, through the "spot on the lawn" method, the multiplication of four serovars of *Salmonella* (*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* and *S. Heidelberg*). The isolated *Lactobacillus* spp. caused more than 2.6 cm of inhibition zone in the multiplication of all serovars. Inhibition was significantly higher for *S. enteritidis* (3.8 cm). The isolate was resistant to five antibiotics of three different classes (cephalothin, ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin and erythromycin). Therefore, although the strain of *Lactobacillus* spp. isolated in this study have shown ability to inhibit the multiplication of *Salmonella* serovars and it showed multiresistance. Therefore, it would not be recommended to be part of a commercial CE product.

Keywords: inhibition, spot on the lawn, *Salmonella* spp., cecal feces, laying hens.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Animais	21
3.2 Amostras	21
3.3 Ensaio microbiológicos	21
3.3.1 Isolamento de <i>Lactobacillus</i> spp.....	21
3.3.2 Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i>.....	22
3.4. Cultivo das estirpes de <i>Salmonella</i> spp.	23
3.5 Determinação Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das culturas de <i>Salmonella</i> spp.....	24
3.6 Método “spot on the lawn” para determinação do poder inibitório do isolado de <i>Lactobacillus</i> spp. frente às estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	24
3.7 Antibiograma	27
3.8 Análise estatística	27
6. CONCLUSÕES.....	32

1. INTRODUÇÃO

Devido às melhorias nas tecnologias de produção, no manejo, sanidade, nutrição e genética, a produção de carne de frango tornou-se uma fonte de proteína animal abundante e de custo acessível à população mundial (TEXEIRA; LIMA, 2008).

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, no ano de 2015 a crise econômica também afetou a avicultura brasileira. Os custos de produção apresentaram elevação, principalmente no segundo semestre, com o aumento dos preços de milho e soja. Mesmo diante de adversidades, o setor encerrou 2015 com recordes na produção e nas exportações de frangos. A carne de frango foi o quarto item da pauta exportadora nacional e alcançou os três melhores resultados mensais do histórico de exportações do setor. A produção de frango atingiu 13,1 milhões de toneladas. Com isso, o Brasil assumiu o segundo lugar mundial em produção de frango, posição antes ocupada pela China (ABPA, 2016).

As salmoneloses são um dos principais problemas de saúde pública. Essas enfermidades possuem elevada prevalência, provocando alta morbidade na população e são de difícil controle. Sua cadeia epidemiológica é complexa, envolvendo animais de produção e os alimentos originados destes (HOFER; REIS, 1994). De acordo com Penha *et al.* (2008), salmonelose consiste em infecções provocadas por microrganismos do gênero *Salmonella*, os quais pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo conhecidos mais 2.600 sorovares até o presente momento. No entanto, cerca de 80 a 90 estão envolvidos nos casos de infecção de saúde humana e animal.

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) com cerca de 2500 dos sorovares e *Salmonella bongori* com 22 sorovares (GRIMONT; WEILL, 2007). A nomenclatura do gênero segue o esquema proposto por POPOFF *et al.* (1996). Segundo este esquema, por exemplo, o sorovar Enteritidis seria descrito como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, ou de forma simplificada *Salmonella* Enteritidis (*S.* Enteritidis) (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Algumas dessas bactérias infectam as aves, podendo causar as salmoneloses aviárias, sendo constituídas por três enfermidades distintas. A pulorose, causada por *S. Pullorum*, o tifo aviário, provocado por *S. Gallinarum* e o paratifo aviário, causado por qualquer outro que não

seja *S. Pullorum* ou *S. Gallinarum* (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009); (GAST, 2007); (PENHA et al., 2008).

Dentre os sorovares causadores do paratifo aviário, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Senftenberg* seriam alguns dos mais frequentes, desencadeando sinais como diarreia, penas arrepiadas e mortalidade, piorando os índices zootécnicos, principalmente em aves jovens (BARROW; WALLIS, 2000). Em aves adultas o quadro clínico pode passar despercebido, ou provocar sinais brandos de inapetência, queda de postura e diarreia (GAST, 2007). A infecção se inicia no trato digestivo. *Salmonella* spp. passa pelo proventrículo e pela moela e coloniza o intestino, principalmente a região cecal (CHAPPELL et al., 2009). Alguns sorovares conseguem transpor a barreira intestinal e realizar infecção sistêmica, sobrevivendo no interior de fagócitos e podendo causar a morte das aves (OKAMURA et al., 2005). A colonização intestinal leva a intensa excreção fecal, favorecendo a disseminação dos sorovares causadores do paratifo no ambiente de criação (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Sorovares causadores do paratifo aviário podem atingir a carne de frango e ovos e, conseqüentemente, provocar infecção alimentar em seres humanos que venham ingerir esses alimentos. Nos Estados Unidos 50% dos surtos de salmonelose em humanos tem sido relacionado ao consumo de alimentos de origem avícola contaminados, principalmente, por *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* (SCHOENI et al., 1995).

Os programas de prevenção e controle de *Salmonella* spp. em criações de aves têm utilizado várias ferramentas nas últimas décadas, sendo que as mais importantes estão as vacinas, ácidos orgânicos, antimicrobianos, prébióticos, probióticos e produtos de exclusão competitiva.

A vacinação como método de prevenção e controle de *Salmonella* spp., deve atender basicamente a três aspectos: a) prevenir ou reduzir a colonização intestinal; b) prevenir a infecção sistêmica; e, c) reduzir ou prevenir a excreção fecal. Prevenindo a infecção sistêmica se reduz a colonização no trato reprodutivo e, portanto a transmissão vertical do microrganismo. Reduzindo a colonização intestinal e excreção fecal se reduz também a contaminação da carcaça, ovos e meio ambiente (cama), relacionada com a transmissão horizontal da bactéria (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

Embora seja uma ferramenta benéfica na prevenção das infecções por alguns sorotipos de *Salmonella* spp. as vacinas são elaboradas com um único sorotipo e, por isso, oferecem proteção cruzada contra um número limitado de sorotipos (BARROW, 2007).

Os ácidos são princípios ativos biodegradáveis muito utilizados nas criações avícolas, porém a eficácia na prevenção da colonização por *Salmonella* spp. é controversa. Quando associados a essa bactéria alguns estudos demonstram eficácia, enquanto que outros não apresentam resultados positivos (ALBUQUERQUE et al., 1998); (WALDDROUP et al., 1995). De qualquer maneira, nas aves, a acidificação dos alimentos utilizando uma mistura apropriada permite modular de maneira positiva a microbiota bacteriana benéfica do intestino reduzindo as bactérias patogênicas (LAMBERT; STRATFORD, 1999). A eficácia do tratamento utilizando ácidos orgânicos é variável e depende do nível inicial de contaminação e da dosagem utilizada (PUMFREY; NELSON, 1991). Essa eficácia também foi demonstrada na redução da transmissão horizontal de *S. Gallinarum* em aves recebendo ração tratada com mistura de ácido fórmico e propiônico (BERCHIERI; BARROW, 1996).

Na salmonelose, a utilização de antibióticos para o tratamento é um assunto em constante discussão. Contudo, em muitos países esta prática tem sido pouco utilizada, devido ao surgimento de resistência, especialmente quando utilizados como promotores de crescimento, acúmulo de resíduos, além de não eliminar os portadores (BIFFI et al., 2014).

Embora o uso de antimicrobianos em aves e outras espécies domésticas esteja sendo desencorajado por razões associadas à resistência bacteriana e resíduos em produtos de origem animal, a utilização vem sendo necessária em alguns casos específicos. Na Europa muitos produtos já foram banidos, como a avoparcina, bacitracina de zinco, virginamicina, fosfato de tilosina, espiramicina, monensina sódica, salinomicina, avilamicina e flavofosfolipol. Nos Estados Unidos a enrofloxacin foi proibida para o uso na produção avícola, porém outros antibióticos que não são permitidos na União Européia (THRELFALL et al., 1997) continuam sendo utilizados.

O que diz respeito o conceito de prebiótico foi introduzido há mais de uma década por Gibson e Roberfroid (1995), e definido como um ingrediente alimentar não digestível que possui efeitos benéficos no hospedeiro (PATTERSON; BULKHOLDER, 2003) por estimulação seletiva do crescimento e da atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon.

Para que um ingrediente seja considerado como prebiótico tem que cumprir os seguintes critérios: a) não deve ser hidrolizado ou absorvido na primeira parte do trato gastrointestinal; b) ser um substrato seletivo para uma ou mais bactérias; e c) como consequência da alteração da microbiota, ser capaz de tornar o ambiente intestinal mais

saudável. Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, alcoóis de açúcares e oligossacarídeos estão dentro do conceito de prebióticos. As substâncias prebióticas agem alimentando e estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam também reduzindo o pH através do aumento da quantidade de ácidos orgânicos presentes nos cecos. Por outro lado, bloqueando os sítios de aderência, imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal. Especula-se que os oligossacarídeos possam atuar também estimulando o sistema imunológico (CORRIER et al., 1991).

O termo probiótico foi introduzido por Lilly e Stilwell em 1965. A definição mais utilizada é a de Fuller (1989) que conceitua probióticos como aqueles microrganismos que adicionados ao alimento afetam benéficamente o equilíbrio do ecossistema intestinal, contribuindo para a proteção contra infecções gastrointestinais e doenças inflamatórias no intestino. *Enterococcus*, *Bacteróid*, *Eubacterium* e especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes em misturas de culturas definidas (CORRIER et al., 1991). Entre os mecanismos de ação descritos para estas substâncias estão: a) produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas e ácidos graxos voláteis) que suprimem as populações ou espécies patogênicas; b) estimulação imune de células residentes, especialmente de macrófagos; c) exclusão competitiva, associado com a competição por sítios de ligação na mucosa; d) concorrência por nutrientes; e, e) protegem os vilos e as superfícies absorptivas contra toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos, permitindo assim, a regeneração da mucosa intestinal lesada (OWENHAND, et al., 1999). No entanto, ainda não apresentam resultados satisfatórios no controle de *Salmonella* spp. (BARROW et al., 2012).

A exclusão competitiva (EC) foi primeiramente descrita em 1973 por Nurmi e Rantala. Foi observado que o conteúdo intestinal de aves adultas normais, administrado oralmente às aves com um dia de idade, altera sua sensibilidade à infecção por *Salmonella* spp., prevenindo a colonização intestinal (MEAD, 2000); (MEAD; BARROW, 1990).

Três mecanismos apresentam importância na prevenção da colonização entérica de pintinhos pré-tratados com produtos de exclusão competitiva: a) os microrganismos que compõem a cultura de EC estabelecem uma flora entérica antes da exposição à *Salmonella* spp.; b) os microrganismos de EC competem com *Salmonella* spp. por nutrientes essenciais, e c) os microrganismos de EC produzem concentrações de ácidos graxos voláteis que diminuem o pH e são bacteriostáticos para *Salmonella* spp. Adicionalmente, foi sugerido que o efeito

mais importante dos produtos de exclusão competitiva é a estimulação não específica da imunidade inata no intestino e o aumento da produção e secreção de imunoglobulina A, que pode contribuir para melhorar a resistência da mucosa intestinal contra a instalação de patógenos entéricos (REVOLLEDO et al., 2006).

A EC é uma das medidas mais eficazes para reduzir a infecção de frangos de corte por *Salmonella* spp. (SCHNEITZ, 2005) e, conseqüentemente, a exposição dos consumidores às infecções alimentares (WIERUP et al., 1992, 1988). Segundo Nurmi e Rantala (1973), um produto de EC deve ser seguro, livre de patógenos para animais e humanos, proteger o animal contra infecção e disseminação de patógenos como *Salmonella* spp., deve ser fácil de manusear, preservar e possuir custo baixo. Vale destacar que para alguns pesquisadores os produtos de EC são também considerados como probióticos (TELLEZ et al., 2011). No entanto, preferiu-se aqui considerar probióticos como sendo culturas contendo mistura de poucos isolados de microrganismos intestinais, incluindo os do gênero *Lactobacillus*.

A maioria dos produtos de EC com boa eficácia utiliza cultivo de microbiota cecal de aves adultas saudáveis (METHNER et al., 1999). Existe a preocupação das autoridades de saúde na utilização de culturas não definidas de conteúdo cecal devido à possibilidade de conterem microrganismos patogênicos e também pelo fato de serem de difícil controle de qualidade na indústria (BARROW et al., 2012).

Com o compromisso de reunir a eficácia da EC com a segurança e consistência de um produto comercial, empresas e pesquisadores desenvolveram produtos ditos de composição microbiológica definida. Embora tenham sido assim denominados, muitos destes ainda carecem de identificação de espécies ou mesmo de gêneros bacterianos que os compõem. Outras formulações contendo culturas definidas menos complexas não conseguiram proteger as aves da infecção por *Salmonella* spp. (COX; CHUNG, 2000). A dificuldade em se desenvolver um produto de EC com composição definida eficaz no controle de *Salmonella* spp. seria consequência da utilização de técnicas de cultivo e identificação inadequadas e também do pouco conhecimento a respeito da microbiota intestinal de aves, resultando em escolha empírica das estirpes da formulação (BARROW et al., 2012); (SCHNEITZ, 2005).

Os estudos a respeito da microbiota de aves têm sido facilitados nos últimos anos pelas tecnologias de sequenciamento (STANLEY et al., 2013). Por exemplo, a amplificação e sequenciamento de regiões conservadas do gene que codifica a porção 16S do ribossomo bacteriano permite a identificação qualitativa e quantitativa de inúmeros gêneros e espécies de

microrganismos que habitam o ceco das aves bem como fatores que contribuem para alterações dessa microbiota (WAITE; TAYLOR, 2014).

As tecnologias de sequenciamento poderiam ser direcionadas para identificar grupos e estirpes de microrganismos cultiváveis predominantes nos produtos de EC obtidos do cultivo de microbiota cecal de aves adultas saudáveis. O que conjuntamente com informações sobre propriedades de cada um desses microrganismos como efeito inibitório sobre *Salmonella* spp., capacidade de adesão ao epitélio intestinal, estimulação e modulação da imunidade de mucosa, capacidade de produção de ácidos graxos voláteis, poderiam ser levados em consideração para elaboração racional de um produto de EC com formulação definida (BARROW et al., 2012).

2. OBJETIVO

Isolar *Lactobacillus* spp. de fezes cecais das aves de postura comercial e avaliar sua capacidade de inibir, *in vitro*, isolados de *Salmonella* causadoras do paratifo aviário.

2.1 Objetivos específicos

- Isolar *Lactobacillus* spp. de fezes cecais de aves de postura comercial adultas.
- Avaliar a capacidade inibitória *in vitro* do *Lactobacillus* spp. isolado frente a *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* e *S. Heidelberg*.
- Avaliar a sensibilidade do isolados *Lactobacillus* spp. frente a alguns antibióticos utilizados na terapêutica humana e veterinária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas aves de postura de uma linhagem leve produtora de ovos brancos criadas no setor de avicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia – PB (CCA-UFPB).

3.2 Amostras

Foram coletadas três amostras de fezes cecais das aves. Cada amostra correspondeu a um “pool” de fezes de quatro locais do galpão. As amostras foram coletadas com auxílio de gazes estéreis e em seguida acondicionadas em tubos contendo 20 mL de caldo DeMan-Rugosa & Sharpe (MRS) (Difco).

3.3 Ensaios microbiológicos

Todas as etapas de cultivo e isolamento dos microorganismos foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, localizado no hospital veterinário do centro de ciências agrárias da UFPB.

3.3.1 Isolamento de *Lactobacillus* spp.

Imediatamente após a coleta, os tubos foram incubados e estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para tubos estéreis contendo 20 mL de caldo MRS. Posteriormente os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas (Figura 1). Posteriormente, as amostras contidas nos tubos foram semeadas, com auxílio de alça bacteriológica, em placas de Petri contendo ágar MRS (Difco), as quais foram incubados a 37°C por 48 horas em estufa bacteriológica.



Figura 1. Tubos contendo caldo MRS. A: Tubo inoculado, B: Tubo sem inoculação.

3.3.2 Identificação do gênero *Lactobacillus*

Foram selecionadas colônias isoladas, pequenas (2-5mm), lisas, brilhantes e sem pigmentos (Figura 2.), as quais foram submetidas às seguintes provas: (a) morfologia, por meio da coloração de Gram, (PELCZAR *et al.*, 1981) (Figura 3.) e (b) teste de catalase (SHARPE, 1981).

As amostras que apresentaram as seguintes características: Bacilos Gram positivos e Catalase negativas foram consideradas sugestivas de pertencerem ao gênero *Lactobacillus*.



Figura 2. Colônias sugestivas de *Lactobacillus* spp. em ágar MRS.

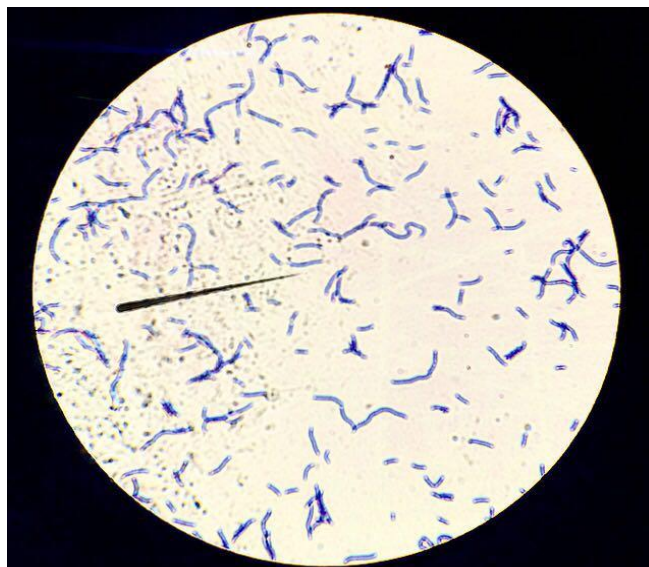


Figura 3. Células bacterianas sugestivas de pertencerem ao gênero *Lactobacillus* coradas pelo método de Gram.

3.4. Cultivo das estirpes de *Salmonella* spp.

Quatro estirpes de *Salmonella* pertencentes aos sorovares Enteritidis, Typhimurium, Senftenberg e Heidelberg foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Angelo Berchieri Junior do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - campus de Jaboticabal. As estirpes estavam estocadas em criotubos contendo caldo de infusão cérebro coração (BHI) (OXOID) acrescido com 30% de glicerol (Sigma Aldrich) e foram armazenadas no Hospital Veterinário em ultrafreezer a -80°C , até o momento sua utilização.

As quatro estirpes foram semeadas em placas contendo ágar verde brilhante, as quais foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, uma colônia de cada estirpe foi inoculada em tubos contendo 5 mL de caldo BHI e, em seguida, incubados em estufa a 37°C por 24 horas.

3.5 Determinação Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das culturas de *Salmonella* spp.

A contagem da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) disponíveis por mL das culturas de cada estirpe foi obtida por diluição seriada em solução salina 0,85%, seguida de plaqueamento em ágar verde brilhante, conforme descrito por Berchieri e Barrow (1996).

3.6 Método “spot on the lawn” para determinação do poder inibitório do isolado de *Lactobacillus* spp. frente às estirpes de *Salmonella* spp.

Para o método de antagonismo “spot on the lawn”, modificado de acordo com Harris et al. (1989), o isolado de *Lactobacillus* spp foi semeado em caldo MRS (Difco), com incubação em estufa a 37°C por 48 horas. Posteriormente, a cultura foi manualmente homogeneizada e 25 µL da mesma foram semeados em forma de ponto no centro de placas de Petri contendo ágar MRS (Difco). As placas foram deixadas em bancada a temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas (Figura 4). Após o período de incubação, 100 µL da cultura de cada microrganismo indicador (*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* ou *S. Heidelberg*) foram transferidos para tubos contendo 10 mL de BHI (Oxoid) acrescidos de 50% ágar triptona de soja (TSA), previamente preparados e mantidos em banho-maria a 45°C (Figura 5). Após a solidificação da camada superior (TSA + BHI + *Salmonella*), as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.



Figura 4. Tubos contendo 10 mL de BHI acrescidos de TSA, mantidos em banho-maria a 45°C para posterior utilização.

A inibição da multiplicação de cada estirpe de *Salmonella* pelo *Lactobacillus* spp. foi mensurada pelo diâmetro final da área de inibição, que correspondeu à diferença entre o halo de inibição total e o diâmetro do ponto de inoculação do *Lactobacillus* spp. (CHATEAU, *et al.*, 1993) (Figura 6). O teste para cada estirpe foi repetido quatro vezes.

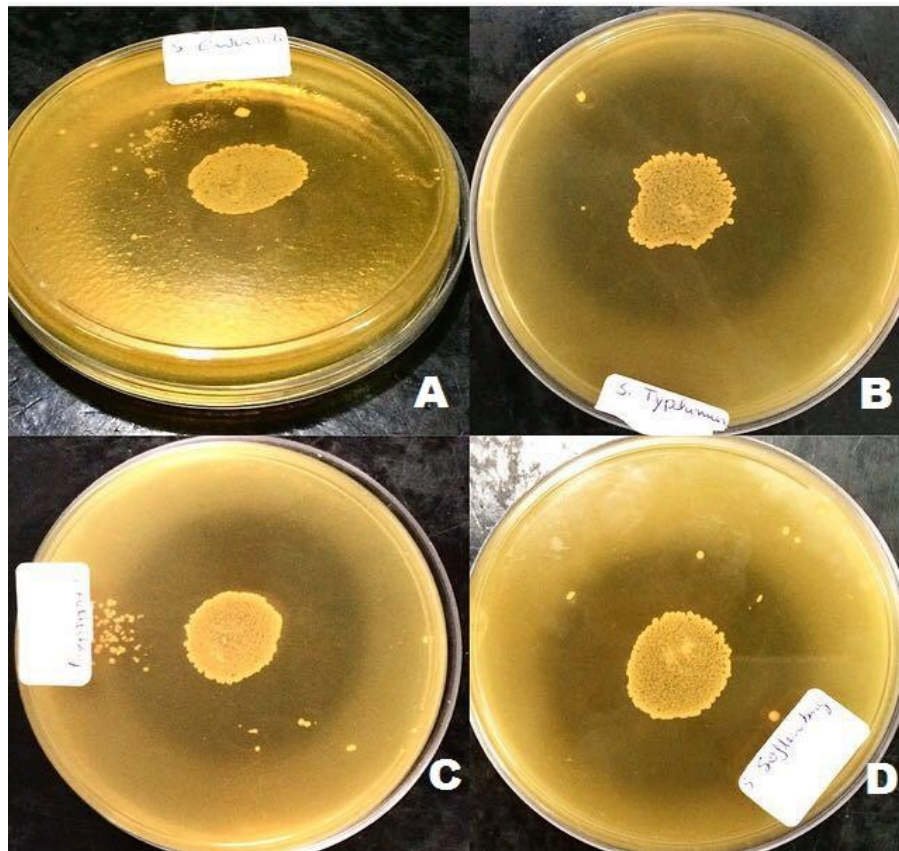


Figura 5. Halo de inibição produzido pelo *Lactobacillus* spp. frente a quatro sorovares de *Salmonella* spp. **A:** *Salmonella* Enteritidis, **B:** *Salmonella* Typhimurium, **C:** *Salmonella* Heidelberg e **D:** *Salmonella* Senftenberg.



Figura 6. Semeadura da multiplicação de uma das estirpes *Salmonella* spp. no método “spot on the lawn”, apenas com inoculação de caldo MRS sem acrescentar *Lactobacillus* spp. (controle negativo).

3.7 Antibiograma

O isolado de *Lactobacillus* spp. foi submetido ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, seguindo a metodologia descrita por Kirby e Bauer (1966) com algumas modificações. Inicialmente as placas contendo MRS (Difco) e os frascos contendo os discos de antibióticos na geladeira foram retirados da geladeira por cerca de 20 minutos e mantidos a temperatura ambiente. Com uma alça bacteriológica metálica, flambada e resfriada, foram selecionadas colônias de *Lactobacillus* spp. as quais foram inoculadas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%). As colônias foram homogeneizadas até a turvação compatível com o grau 0,5 da escala MacFarland (1×10^6 UFC/mL). Para isso, foi utilizado, como comparativo, um tubo previamente aferido a 0,5 da referida escala. Em seguida, 100 µL da amostra diluída foi semeada em placa contendo ágar MRS (Difco). Posteriormente, com auxílio de um alça de Drigalski, a amostra foi semeada em todas as direções na placa (cinco direções), procurando abranger toda a superfície do ágar. Após 15 minutos, com auxílio de uma pinça flambada, foram colocados de forma equidistante, diferentes discos impregnados com os seguintes antibióticos Amicacina (AMI); Ampicilina (AMP); Azitromicina (AZI); Ciprofloxacina (CIP); Cefalotina (CFL); Clindamicina (CLI); Cloranfenicol (CLO); Doxiciclina (DOX); Eritromicina (ERI); Enrofloxacin (ENO); Estreptomicina (EST); Gentamicina (GEN); Neomicina (NEO); Norfloxacin (NOR); Penicilina G (PEN); Sulfazotrim (SUT); Tetraciclina (TET). Logo após o processo as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas (CHAVES et al., 1999). Para avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos foi utilizado os limites de medidas de halos, definidos por Charteris et al. (1998). Os resultados foram expressos como resistência (R), susceptibilidade moderada (SM) ou susceptibilidade (S).

3.8 Análise estatística

As médias da inibição de multiplicação dos quatro sorovares de *Salmonella* spp. foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para isso utilizou-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA et al., 2009).

4. RESULTADOS

O cultivo das três amostras de fezes cecais examinadas resultou na seleção de uma estirpe sugestiva de pertencer ao gênero *Lactobacillus* spp. O microrganismo é Gram positivo, resultado negativo na prova da catalase e colônias morfologicamente semelhantes às descrições prévias do gênero.

Os resultados das contagens em unidades formadoras de colônias de bactérias nas culturas dos quatro sorovares de *Salmonella* foram de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL para *S. Enteritidis*, $2,6 \times 10^8$ UFC/mL para *S. Typhimurium*, 4×10^8 para *S. Heidelberg* e de 2×10^8 UFC/mL para *S. Senftenberg*.

Os resultados da avaliação da inibição *in vitro* do isolado de *Lactobacillus* spp. frente aos quatro sorovares de *Salmonella* estão disponíveis na tabela 1.

Tabela 1. Resultado da inibição da multiplicação de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Senftenberg* frente ao isolado de *Lactobacillus* spp.

Sorovar de <i>Salmonella</i>	*Inibição da multiplicação				Média $\pm \sigma$
	(IM) R1	IM R2	IM R3	IM R4	
Enteritidis	4,0	3,8	3,7	3,7	3,8 a $\pm 0,14$
Typhimurium	3,4	3,3	3,3	3,2	3,3 b $\pm 0,08$
Heidelberg	3,1	3,0	2,7	2,5	2,8 c $\pm 0,27$
Senftenberg	3,0	2,7	2,7	2,6	2,7 d $\pm 0,17$

*IM= corresponde à medida em centímetros (cm) do diâmetro do halo de inibição da multiplicação de *Salmonella* subtraído do diâmetro do ponto de inoculação do *Lactobacillus* spp. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

A tabela 2 demonstra o perfil de resistência antimicrobiana do isolado de *Lactobacillus* spp.

Tabela 2. Perfil de resistência a antimicrobianos de um isolado de *Lactobacillus* spp.

Antimicrobiano	Classe	Concentração	Diâmetro do halo (mm)	Classificação ¹
Amicacina	Aminoglicosídeo	30 µg	19	S
Ampicilina	β – lactâmico	10 µg	35	S
Clindamicina	Lincosamina	2 µg	32	S
Cloranfenicol	Cloranfenicol	30 µg	26	S
Estreptomicina	Aminoglicosídeo	10 µg	16	S
Gentamicina	Aminoglicosídeo	10 µg	26	S
Penicilina G	β – lactâmico	10 µg	45	S
Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	21	S
Azitromicina*	Macrolídeo	15 µg	13	S
Doxiciclina*	Tetraciclina	30 µg	27	S
Neomicina*	Aminoglicosídeo	30 µg	25	S
Sulfazotrim*	Sulfonamida	25 µg	30	S
Cefalotina	Cefalosporina	30 µg	0	R
Enrofloxacin*	Quinolona	5 µg	10	R
Eritromicina	Macrolídeo	15 µg	0	R
Ciprofloxacina	Quinolona	5 µg	0	R
Norfloxacin	Quinolona	10 µg	0	R

¹= Os resultados são expressos como R (resistente), S (susceptível) ou MS (moderadamente susceptível)

* = Antimicrobianos descritos na tabela de classificação descrita pela ANVISA 2005 .

5. DISCUSSÃO

A criação de aves em sistema intensivo favorece a multiplicação e disseminação de *Salmonella* spp. Mesmo com os avanços nas etapas de abate e processamento de ovos, esse microrganismo ainda consegue chegar ao alimento e, conseqüentemente, causar infecção alimentar nos consumidores. Por isso, a busca por métodos eficientes para controle das infecções por *Salmonella* spp. nas criações avícolas tem sido constante. Entre estes o desenvolvimento de produtos de exclusão competitiva (EC) são os que vêm apresentando os melhores resultados.

Segundo Nurmi e Rantala (1973), um produto de EC deve ser seguro, livre de patógenos para animais e humanos, proteger o animal contra infecção e disseminação de patógenos como *Salmonella* spp., deve ser fácil de manusear, preservar e possuir custo baixo. A maioria dos produtos de EC com boa eficácia utiliza cultivo de microbiota cecal de aves adultas saudáveis (METHNER et al., 1999). No entanto, há preocupação das autoridades de saúde na utilização de culturas não definidas devido à possibilidade de conterem microrganismos patogênicos e também pelo fato de serem de difícil controle de qualidade na indústria (BARROW et al., 2012).

A tentativa de reunir a eficácia da EC com a segurança e consistência de um produto comercial, vem fazendo com que empresas e pesquisadores tentem desenvolver os produtos ditos de composição microbiológica definida (COX; CHUNG, 2000). A seleção de estirpes para comporem um produto de EC se inicia com o isolamento e posteriores testes *in vitro*, incluindo o método “spot on the lawn” para verificar o poder inibitório da estirpe frente a isolados de *Salmonella* spp. (LEWUS et al., 1991).

Segundo Cox et al. (2000) os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* são alguns dos principais da composição dos produtos de EC. No presente estudo foi isolado um microrganismo sugestivo de pertencer ao gênero *Lactobacillus*.

Os *Lactobacillus* spp. sabidamente estimulam a secreção de imunoglobulina IgA secretória, auxiliando a imunidade intestinal (ANDREATTI-FILHO, 2007). Aliado a isso, secretam lactato, acetato, succinato e etanol, auxiliando na proliferação de outros gêneros com propriedades benéficas como os *Bacillus*, *Bifidiobacteriuim* e *Bacteriodes*. Em conjunto esses microrganismos promovem a redução da concentração de oxigênio, além de produzir ácidos graxos voláteis, diminuir o pH e se ligarem à mucosa intestinal, restringindo a multiplicação de bactérias patogênicas como b *Salmonella* spp. (ITO et al, 2007). Estudos comprovam que

os *Lactobacillus* spp. possuem a propriedade de produzir substâncias antimicrobianas como bacteriocinas (COCCONCELLI, 1993). Portanto, são realmente bons candidatos para composição dos produtos de EC de composição definida.

No presente estudo, utilizando-se o método “spot on the lawn”, o isolado de *Lactobacillus* spp. apresentou melhor poder inibitório frente a multiplicação do sorovar Enteritidis ($P<0,05$), quando comparado aos outros sorovares (Typhimurium, Senftenberg e *S. Heidelberg*). Ao comparar os resultados do presente estudo com os de Barros et al. (2009), verifica-se que o poder inibitório verificado no presente estudo foi superior ao descrito pelos referidos pesquisadores. Lima *et al.* (2009) também avaliou a atividade inibitória de *Lactobacillus salivarius* frente a 15 isolados de *S. Enteritidis* pelo método “spot on the lawn”. Os halos de inibição variaram de 12 a 24 mm, resultados também inferiores aos encontrados no presente estudo. Portanto, considerando apenas a propriedade de inibição *in vitro* de *Salmonella* spp., a estirpe isolada no presente estudo seria um bom candidato a compor um produto de EC.

Análise do perfil de resistência do isolado de *Lactobacillus* spp. obtido indica que o mesmo é resistente a pelo menos 5 diferentes antimicrobianos. A cefalotina, um antibiótico da classe das cefalosporinas de primeira geração; a ciprofloxacina, uma quinolona de segunda geração; a norfloxacina e enrofloxacina pertencentes à classe das fluoroquinolonas (subclasse das quinolonas) e a eritromicina, da classe dos macrolídeos. Embora os produtos de EC contendo *Lactobacillus* spp. ofereçam benefícios a saúde intestinal de aves, não é desejável que os mesmos contenham estirpes resistentes à antimicrobianos, pois podem interagir com outras bactérias da microbiota, incluindo *Salmonella* spp., e transferir genes de resistência a essas (DUŠKOVÁ; ARPÍŠKOVÁ, 2013).

De acordo com Magiorakos et al. (2011), uma junta de pesquisadores de diferentes e representativos órgãos de saúde pública do mundo definiram que bactérias Gram positivas são consideradas multiresistentes ao apresentarem resistência a três ou mais classes de antibióticos. Portanto, embora a estirpe isolada tenha mostrado capacidade de inibir a multiplicação de sorovares de *Salmonella* spp., o mesmo apresentou multiresistência a três classes de antibióticos e não deveria ser utilizada na composição de um produto comercial de EC. Embora muitos pesquisadores e empresas não avaliem as características de resistências a antimicrobianos durante a seleção de estirpes com propriedades probióticas (ANDREATTI et al., 2007); (BARROS et al., 2009); (COX; CHUNG, 2000), esses testes deveriam ser praticados.

6. CONCLUSÕES

- É possível isolar *Lactobacillus* spp. de fezes cecais de aves adultas.
- O isolado de *Lactobacillus* spp. é capaz de inibir os quatro sorovares de *Salmonella* (*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* e *S. Heidelberg*).
- O isolado é resistente a cinco antibióticos de três classes diferentes (cefalotina, ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina e eritromicina).

7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* spp. Braz. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 279-282, 1998.

ANDREATTI FILHO, R. L. Paratifo aviário. IN: ANDREATTI FILHO, R. L. Saúde aviária e doenças. São Paulo: **Rocca Ltda**, 2007, cap. 9, p. 112- 117.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório anual 2016. São Paulo: 2016. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf. Acesso em: 20 mai. 2016.

ANVISA. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15o Suplemento Informativo. v. 25, n. 1, 2005. 177p.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; CROCCI, J. A. In vitro evaluation of the inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from crop and ceca of chickens against *Salmonella* serotypes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 863-868, 2009.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2007.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; SMITH, A. L.; WIGLEY, P. The long view: *Salmonella*—the last forty years. **Avian Pathology**, v. 41, n. 5, p. 413-420, 2012.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning *salmonella* serotypes; Microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988.

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against Salmonella infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. **Salmonella in domestic animals**. CAB International, Oxford, England, v. 323339, 2000.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BERCHIERI J. A.; BARROW, P. A. The antibacterial effects for Salmonella Enteritidis phage type 4 of different chemical disinfectants and cleaning agents tested under different conditions. **Avian pathology**, v. 25, n. 4, p. 663-673, 1996.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. 2º ed. Campinas: **FACTA**, 2009. p. 435-454.

BIFFI, G.; DI ANTONIO, M.; TANNAHILL, D.; BALASUBRAMANIAN, S. Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. **Nature chemistry**, v. 6, n. 1, p. 75-80, 2014.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1, p. 53-59, 2009.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMIS, A .M. Distribution of pathogen inhibition in the Lactobacillus isolation of a commercial probiotic consortium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 1, p.36-40, Jan.1993.

CHAVES, A. H.; SILVA, J. F. C. D.; PINHEIRO, A. J. R.; VALADARES FILHO, S. D. C.; CAMPOS, O. F. D. Selection of isolates of *Lactobacillus acidophilus* used as probiotic for calves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 1093-1101, 1999.

COCCONCELLI, P.S. Aspetti molecular de batteriocine prodolte da *Lactobacillus*. **Annals of microbiology**, v. 43, p. 37-44, 1993.

CORRIER, D. E.; HARGIS, B.; HINTON JR. A.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNING, J.; DELOACH, J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian diseases**, p. 337-343, 1991.

COX, J. M.; CHUNG, B. L. Competitive exclusion: probiotic preparations for poultry. Proc./lust. **Poultry Science**, Sym, p. 2, fev. 2000.

DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food. Czech. **Journal of Food Science**, v. 31, p. 27-32, 2013.

FULLER, Ray. A review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GAST, R. K. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. **Avian diseases**, v. 51, n. 4, p. 817-828, 2007.

GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, v. 9, 2007.

HOFER, E.; REIS, E.M.F. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.36, n.1, p.7-9, 1994.

IMPEY, C. S.; MEAD, G. C.; GEORGE, S. M. Competitive exclusion of salmonellas from the chick caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird. **Journal of Hygiene**, v. 89, n. 03, p. 479-490, 1982.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Aviagen Brasil**. 2007. Disponível em: http://www.aviagen.com/as_sets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/novembro2007saudeintestinalemfrangosdecorte.pdf. Acesso em: 24 de maio de 2016.

LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 157-164, 1999.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1683-1688, 1991.

LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L.; GONÇALVES, G. A. M.; ROCHA, T. S.; MENCONI, A.; OKAMOTO, A. S. Perfil de sensibilidade de Salmonella enterica sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por Lactobacillus reuteri e Lactobacillus salivarius. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 180-189, 2009.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MEAD, G. C. Microbial ecology of the digestive tract. Montreal: WPSA, 2000. 8 p. CD-ROM.

MEAD, G. C.; BARROW, P. A. Salmonella control in poultry by 'competitive exclusion' or immunization. **Letters in applied microbiology**, v. 10, n. 6, p. 221-227, 1990.

MEAD, G. C.; BARROW, P. A.; HINTON, M. H.; HUMBERT, F.; IMPEY, C. S.; LAHELLEC, C.; MULDER, W. A.; STAVRIC, S.; STERN, N. J. Recommended assay for treatment of chicks to prevent *Salmonella* colonization by 'competitive exclusion'. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 7, p. 500-502, 1989.

METHNER, U.; BARROW, P. A.; BERNDT, A.; STEINBACH, G. Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. **International journal of food microbiology**, v. 49, n. 1, p. 35-42, 1999.

NAKAMURA, A.; OTA, Y.; MIZUKAMI, A.; ITO, T.; NGWAI, Y. B.; ADACHI, Y. Evaluation of Aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response of chicks to *Salmonella*. **Poultry Science**, v.81, n.11, p.1653-1660, 2002.

NEAL-MCKINNEY, J. M.; LU, X.; DUONG, T.; LARSON, C. L.; CALL, D. R.; SHAH, D. H.; KONKEL, M. E. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e43928, 2012.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v.241, p.210, 1973.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; RAYBOURNE, R. B.; BABU, U. S.; HECKERT, R. A.; TANI, H.; LILLEHOJ, E. P. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 107, n. 3, p. 327-335, 2005.

OUWEHAND, A. C.; NIEMI, P.; SALMINEN, S. J. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. **FEMS microbiology letters**, v. 177, n. 1, p. 35-38, Ago. 1999.

PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry science**, v. 82, n. 4, p. 627-631, 2003.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo: Mcgraw Hill, 1981. p. 1072.

PENHA, G. A.; SUZUKI, E. Y.; UEDA, F. S.; PERES PEREIRA, R. E. Diagnóstico da salmonelose e sua importância para a avicultura: Revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, São Paulo, n.10, p. (irregular), 2008.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F.W. Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 147, n. 39, p. 765-769, Nov./Dez. 1996.

PUMFREY, L; NELSON, C. E. Use of a most probable number method modified with a deoxyribonucleic acid probe to monitor control by food preservatives of natural Salmonella contamination in animal meat meals. **Poultry science**, v. 70, n. 4, p. 780-784, 1991.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Prevention of Salmonella Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. **Poultry science**, v. 88, n. 4, p. 734-743, 2009.

SHARPE, M.E. The genus Lactobacillus. In: _____.The Prokaryotes. [s.l.: s.n.], 1981, v. 2, p. 1653.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistant-statistical assistance software. In: Computers in Agriculture and Natural Resources, 23-25 July 2006, Orlando Florida. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

TEIXEIRA, L.C.; LIMA, A.M.C. Ocorrência de salmonella e listeria em carcaças de frango oriundas de dois sistemas de criação no município de campinas. **Archives of Veterinary Science**, São Paulo, v.13, n.3, p.191-196, 2008.

THRELFALL, E. J.; WARD, L. R.; ROWE, B. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. **Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 2, n. 11, p. 81-84, 1997.

VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. **Poultry science**, v. 84, n. 12, p. 1851-1856, 2005.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P.; MEAD, G. C. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n. 2, p. 341-351, 2006.

SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry-30 years of research. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 657-667, 2005.

SCHOENI, J. L.; GLASS, K. A.; McDERNOTT, J. L.; WONG, A. C. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. **Int. J. Food Microbiol.**, v.24, n.3, p. 385-96, Jan. 1995.

STANLEY, D; GEIER, M. S.; HUGHES, R. J.; DENMAN S. E.; MOORE R. J. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84290, Dez. 2013.

TELLEZ, C. S.; JURI, D. E.; DO, K.; BERNAUER, A. M.; THOMAS, C. L.; DAMIANI, L. A., BELINSKY, S. A. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. **Cancer research**, v. 71, n. 8, p. 3087-3097, 2011.

WALDROUP, A.; KANIAWATI, S.; MAUROMOUSTAKOS, A. Performance characteristics and microbiological aspects of broilers fed diets supplemented with organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 5, p. 482 - 489, 1995.

WIERUP, M.; WAHLSTRÖM, H.; ENGSTRÖM, B. Experience of a 10-year use of competitive exclusion treatment as part of the Salmonella control programme in Sweden.

International journal of food microbiology, v. 15, n. 3 - 4, p. 287-291, 1992.

WIERUP, M.; WOLD-TROELL, M.; NURMI, E.; HÄKKINEN, M. Epidemiological evaluation of the Salmonella-controlling effect of a nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. **Poultry Science**, v. 67, n. 7, p. 1026-1033, 1988.

YAMAZAKI, M.; OHTSU, H.; YAKABE, Y.; KISHIMA, M.; ABE, H. In vitro screening of lactobacilli isolated from chicken excreta to control Salmonella Enteritidis and Typhimurium.

British Poultry Science, v. 53, n. 2, p. 183-189, 2012.